

[ r e v i s i ó n ]

## Efecto de los polifenoles de los alimentos sobre el riesgo vascular

Juan Duarte<sup>1</sup>, Pilar Galindo<sup>1</sup>, Francisco Pérez-Vizcaíno<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

### Palabras clave

flavonoides,  
quercetina,  
hipertensión, función  
endotelial,  
aterosclerosis,  
neuroprotección

### >>RESUMEN

Los polifenoles son compuestos de origen natural que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los flavonoides son la principal clase de polifenoles y están presentes en cantidades considerables en frutas y verduras. Además de sus efectos antioxidantes, hay un impresionante número de enzimas cuya actividad es modulada (en su mayoría inhibida) por ellos. Potencialmente pueden interactuar con muchas dianas moleculares conocidas, involucradas en la fisiopatología de la enfermedad isquémica cardiaca y en el accidente cerebrovascular, actuando por múltiples mecanismos, que operan tanto

en la prevención a largo plazo como en la fase aguda de eventos cardiovasculares. Hay evidencias sólidas de que, *in vitro*, los flavonoides ejercen: 1) efectos vasodilatadores dependientes e independientes del endotelio, 2) efecto protector sobre el óxido nítrico y la función endotelial bajo condiciones de estrés oxidativo, 3) efectos antiagregantes plaquetarios, 4) inhibición de la oxidación de LDL, 5) reducción de las moléculas de adhesión y otros marcadores inflamatorios y 6) prevención en el daño neuronal oxidativo e inflamatorio. En modelos animales, la quercetina, principal flavonoide dietético, produce indiscutibles efectos antihipertensivos y antiaterogénicos, previene la disfunción endotelial y protege el miocardio del daño isquémico. En humanos la quercetina origina un efecto antihipertensivo, mientras que no hay datos disponibles sobre la función endotelial y la aterosclerosis. Algunas evidencias también indican efectos diferenciales en función de los antecedentes genéticos de los pacientes. El metaanálisis de estudios epidemiológicos demuestra una asociación inversa entre el consumo de flavonoles (junto con flavonas) y la enfermedad coronaria y los accidentes cerebrovasculares. Por lo tanto, aunque todavía no hay pruebas sólidas, importantes evidencias sugieren que los flavonoides pueden prevenir las formas más comunes de enfermedad cardiovascular, contribuyendo a los efectos protectores asociados al consumo de frutas y verduras.

*Nutr Clin Med* 2012; V (3): 107-125

### Correspondencia

Juan Duarte. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja, s/n. 18071. Granada.  
Email: [jmduarte@ugr.es](mailto:jmduarte@ugr.es)

## Key words

flavonoids, quercetin, hypertension, endothelial function, atherosclerosis, neuro-protection

## >>ABSTRACT

Polyphenols are naturally occurring compounds widely found in Nature. Flavonoids are the main class of polyphenols and they are present in considerable amounts in fruits and vegetables. Together with their antioxidant effects, a high number of enzymes are modulated by these compounds (most of them are inhibited by them). They may potentially interact with many known molecular targets involved in the pathophysiology of coronary heart disease and cerebrovascular events, acting by multiple mechanisms implicated in both long-term prevention and the acute phase of cardiovascular events. There is robust evidence showing that, *in vitro*, flavonoids may have: 1) endothelium-dependent and independent vasodilating effects; 2) a protective effect on nitric oxide and endothelial function under oxidative stress conditions; 3) anti-platelet aggregation effects; 4) inhibition effects on LDL-oxidation; 5) an effect on the reduction of adhesion molecules and other inflammation markers; and 6) a preventive effect on oxidative and inflammatory neural damage. In animal models, quercetin, the main dietary flavonoid, has unquestionable anti-hypertensive and anti-neurogenic effects, prevents endothelial dysfunction, and protects the myocardium from ischemic damage. In humans, quercetin has an anti-hypertensive effect, whereas there are no available data on the endothelial function and atherosclerosis. Some evidence also shows differential effects depending on the genetic background of the patients. A meta-analysis of the epidemiological studies shows a negative correlation between flavonoids (and flavones) intake and coronary heart disease and cerebrovascular accidents. Thus, although there is still no solid evidence, important works suggest that flavonoids may prevent the most common forms of cardiovascular disease by contributing to the protective effects associated to the intake of fruits and vegetables.

*Nutr Clin Med* 2012; V (3): 107-125

## >>INTRODUCCIÓN

Desde la década de los años 80, en la que se comenzó a poner de manifiesto el papel de los radicales libres, y su capacidad oxidante, en la génesis y en el crecimiento de la placa de ateroma, existe la creencia generalizada de que los compuestos con capacidad antioxidante podrían protegernos y reducir la incidencia y la mortalidad de episodios isquémicos cardíacos. Esta hipótesis estaba avalada por estudios epidemiológicos que demostraron que el consumo de dietas con alto contenido en polifenoles antioxidantes reducía la mortalidad por cardiopatía isquémica. Sin embargo, no existen estudios de intervención en los que se analicen los efectos, a corto o a largo plazo, de polifenoles concretos sobre las enfermedades cardiovasculares, que son la primera causa de muerte en las sociedades desarrolladas.

Los polifenoles son compuestos de origen natural que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los flavonoides son la principal clase de polifenoles, que además de sus efectos antioxidantes, presentan un amplio abanico de actividades farmacológicas<sup>1</sup>. Sin embargo, sólo un número pequeño de estos compuestos,

de los que se han descrito más de 5000, se han estudiado actualmente. Estos compuestos han llamado la atención de nutricionistas y farmacólogos por diversas de razones: 1) Por su abundancia en frutas y verduras, los flavonoides pueden ser los responsables de los efectos cardiosaludables de estos alimentos; 2) Algunos alimentos son particularmente ricos en flavonoides, por ejemplo, el té, el vino tinto, la cebolla, los tomates, la soja, el cacao y el chocolate negro, cuyos efectos beneficiosos cardiovasculares son bien conocidos; 3) Algunos productos derivados de estos alimentos, como extractos polifenólicos del vino tinto, han sido comercializados como suplementos dietéticos; 4) Plantas medicinales ricas en flavonoides o sus extractos (por ejemplo, extractos estandarizados de las hojas de *Ginkgo biloba*) se utilizan en medicina; y 5) Polifenoles específicos (por ejemplo, quercetina y resveratrol) están disponibles en algunos países como nutracéuticos.

Los flavonoides son sustancias producidas como metabolitos secundarios por las plantas, donde ejercen diversas funciones como antifúngicos, bactericidas, quelantes de metales, protectores de radiación ultravioleta, colorantes y con-

troladores de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación en los vegetales, cuyo elemento estructural común es que todas poseen un esqueleto de difenilpirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano<sup>2</sup>. Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas (fig. 1).

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidad variable en frutas, verduras, semillas, especias y bebidas derivadas de vegetales, como el té, las infusiones, el mosto, los zumos y el vino, por lo que entran a formar parte de nuestra dieta<sup>3</sup>. El consumo diario medio en humanos de flavonoles más flavonas se ha calculado en unos 20-25 mg<sup>4</sup>, pero hay grandes variaciones dependiendo de los hábitos nutricionales y las zonas geográficas. El vino tinto, por ejemplo, contiene 1,8 g/l de polifenoles, entre los que los flavonoides forman el grupo mayoritario, con concentraciones entre 1,36-1,5 g/l<sup>5</sup>.

Cuantitativamente, los flavanoles representan el grupo más importante dentro de los flavonoides en la dieta occidental<sup>6</sup>. Entre sus principales fuentes podemos citar la uva de vinificación (*Vitis vinifera*), la mora (*Rubus spp.*), el té (*Camellia sinensis*) y el cacao (*Theobroma cacao*). Sin embargo, no debemos olvidar que la concentración de flavanoles en estos alimentos varía considerablemente y que ésta puede verse afectada como consecuencia del procesamiento tecnológico<sup>7</sup>. En el caso concreto de los mostos y vinos, están presentes sobre todo la (+)-catequina y la (-)-epicatequina<sup>8</sup> y en el cacao y chocolate, la (-)-epicatequina<sup>9</sup>. La ingesta media diaria de flavanoles en un adulto se ha calculado en torno a los 50 mg<sup>10</sup>. En el caso concreto de España, se ha estimado entre 18 y 50 mg al día<sup>11</sup>. Si analizamos más estudios, las diferencias son mayores; y es que, entre otras limitaciones, en la literatura hay una notable confusión al respecto, ya que muchos autores no hacen distinción entre los flavanoles monoméricos y las proantocianidinas<sup>10</sup>.

El interés en los flavonoides presentes en la dieta ha aumentado en los últimos años debido a la publicación de varios estudios epidemioló-

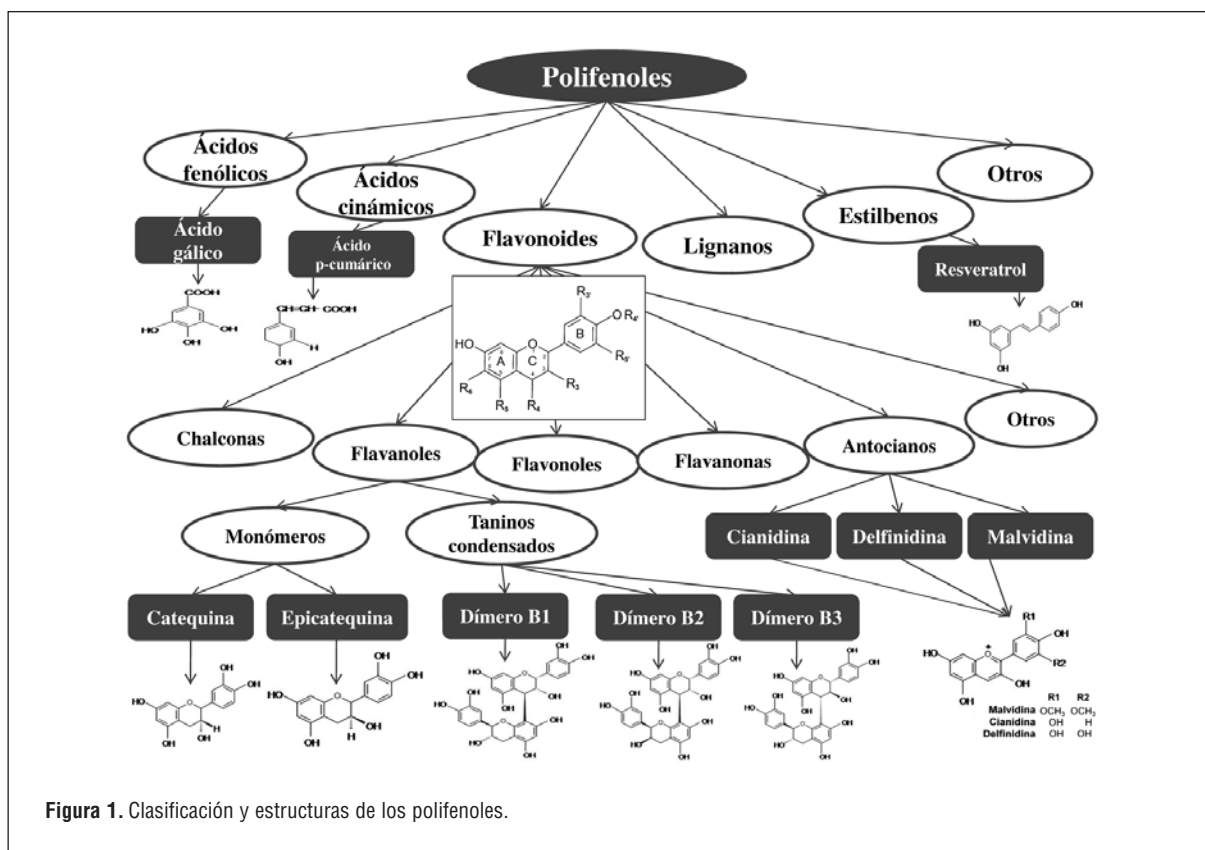


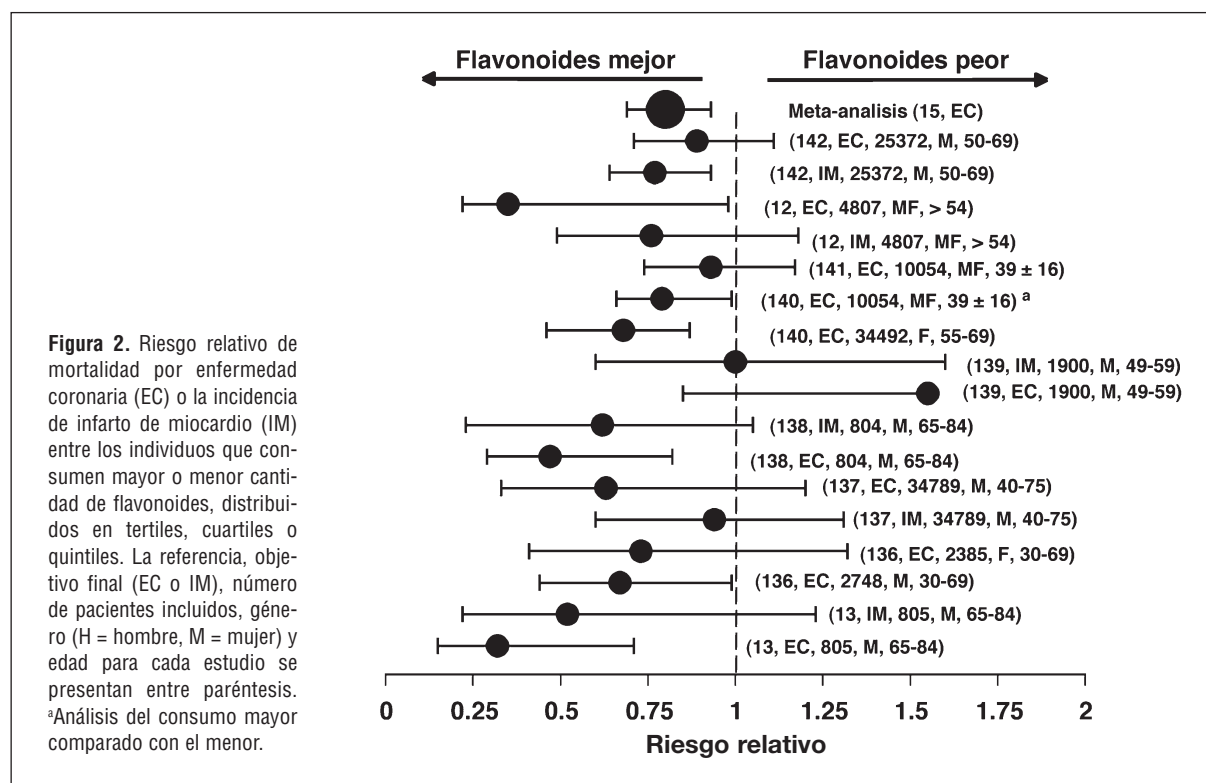
Figura 1. Clasificación y estructuras de los polifenoles.

gicos que han mostrado una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoles y flavonas, y una menor incidencia y mortalidad de cáncer y enfermedades cardiovasculares<sup>12,13,14</sup>. El meta-análisis de siete estudios de cohortes prospectivos determinó que estar entre los individuos del tercio superior en la ingesta diaria de flavonoles se asociaba a un menor riesgo de mortalidad debida a enfermedad coronaria, comparados con el tercio inferior después de ajustar el resto de factores de riesgo y de otros componentes dietéticos<sup>15</sup> (fig. 2).

Estos datos han despertado el interés por analizar los efectos de los flavonoides en el endotelio vascular, como demuestran el gran número de estudios experimentales e incluso algunos clínicos<sup>16,17</sup>, ya que parece ser una de las claves de sus efectos cardioprotectores. La dificultad estriba en que al ser los flavonoides un grupo tan numeroso y heterogéneo, sus efectos pueden diferir entre ellos tanto cuantitativa como cualitativamente. La mayoría de los datos disponibles se basan en alimentos ricos en flavonoides, como el cacao, o en bebidas que los contienen en altas proporciones, como el vino, los zumos y el té; o en extractos de vino o zumos de frutas; o en algunos compuestos aislados como kaempferol,

delfinidina y quercetina; lo cual hace muy difícil extrapolar resultados al comparar unos con otros. El flavonol quercetina representa el 60-75% del total de flavonoles más flavonas de la dieta<sup>13</sup>, siendo las principales fuentes de flavonoles las cebollas (350-1200 mg/kg), la col rizada, el puerro y los tomates cherrys<sup>4</sup>.

Hoy en día, más de 30.000 estudios han sido publicados sobre los flavonoides y más de 10.000 tratan sobre uno sólo de ellos: la quercetina. Los flavonoles muestran una amplia gama de actividades biológicas, siendo los compuestos más activos dentro del grupo de los flavonoides. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de las dietas ricas en frutas y verduras, en la salud cardiovascular, han sido a menudo atribuidos a los flavonoides en general y más específicamente a los flavonoles. Los flavonoles son comercializados como suplementos dietéticos, ya sea como compuestos puros (quercetina), como mezclas de flavonoides o como extractos, a menudo a dosis que exceden en gran medida la ingesta dietética. Algunos flavonoides también se utilizan como fármacos venotónicos para el tratamiento de varias enfermedades venosas<sup>18</sup>. Los polifenoles pueden proteger el sistema cardiovascular previniendo la oxidación de las



lipoproteínas de baja densidad (LDL), la adhesión y la agregación plaquetaria y la migración y proliferación de células musculares lisas vasculares. Alternativamente, la protección vascular puede estar relacionada con una acción directa de los polifenoles sobre la función endotelial.

En este artículo se pretende hacer una revisión sobre el continuo crecimiento de las evidencias que apoyan el papel beneficioso de los flavonoles en las enfermedades cardiovasculares y las potenciales dianas moleculares involucradas. La mayoría de los estudios se llevaron a cabo con la quercetina. Los datos disponibles indican efectos biológicos similares cualitativamente del kaempferol, la isorhamnetina y la tamarixetina. La miricetina comparte con otros flavonoles algunas de sus acciones, pero puede presentar diferentes e incluso, algunas veces, efectos opuestos. Una cuestión interesante, que ha sido el centro de atención en los últimos años, es si las observaciones realizadas *in vitro* con quercetina y otros flavonoides, tienen alguna relevancia *in vivo*. La actividad biológica de los flavonoides ha sido analizada usando compuestos agliconas disponibles comercialmente (no glicosilados) que están presentes en muy bajas concentraciones en plasma<sup>19</sup>. La quercetina es rápidamente conjugada con el ácido glucurónico y/o sulfato durante el metabolismo de primer paso (intestino-hígado) y una porción de dichos metabolitos son también metilados; por lo tanto, los metabolitos de quercetina que se encuentran en mayor proporción en el plasma humano son la quercetina-3-glucuronido, la quercetina 3'-sulfato y la isorhamnetina-3-glucuronido. La información disponible sobre los efectos *in vitro* de estos metabolitos, aunque limitada, también se revisará en este artículo. En general, estos metabolitos son menos activos que los componentes de origen y, algunas veces, totalmente inactivos. Sin embargo, también es cada vez más evidente que los metabolitos conjugados pueden ser desconjugados por  $\beta$ -glucuronidasas y los flavonoles agliconas pueden acumularse en los tejidos<sup>20</sup>. Hay algunas evidencias indirectas sobre que las actividades de los glucuronidos de quercetina dependen de su desconjugación<sup>21</sup>.

## >>FLAVONOIDES, EL ENDOTELIO Y EL MÚSCULO LISO VASCULAR

El endotelio vascular ejerce un control fino en la homeostasis cardiovascular. El equilibrio fisioló-

gico entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, factores protrombóticos y antitrombóticos, y factores proliferativos y antiproliferativos está desplazado en las enfermedades cardiovasculares, lo que conduce a hipertensión, aterosclerosis, agregación plaquetaria e isquemia. La disfunción endotelial está caracterizada por un deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio, la reducción de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y un estado protrombótico y proinflamatorio de las células endoteliales. Esta alteración en la función endotelial es un marcador precoz e independiente de mal pronóstico en la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular<sup>22,23</sup>.

Los polifenoles estimulan la formación de óxido nítrico (NO) endotelial y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) en arterias aisladas y mejoran la función endotelial en modelos experimentales de enfermedad cardiovascular y en humanos.

Los efectos de la quercetina y los flavonoides relacionados sobre la modulación de la función y la disfunción endotelial han sido ampliamente estudiados<sup>24</sup>. La quercetina ejerce directamente efectos vasodilatadores agudos en arterias aisladas<sup>25,26,27</sup>. Estos efectos son independientes del endotelio y se producen de manera similar, aunque con diferente potencia, en arterias contraídas con distintos estímulos. Curiosamente, la quercetina y sus metabolitos metilados son más potentes en arterias coronarias<sup>28</sup> y en arterias de resistencia que en vasos de conductancia<sup>29</sup>. También son más potentes vasodilatadores en las arterias de animales hipertensos que en las de normotensos<sup>30</sup>. Los mecanismos moleculares involucrados podrían estar relacionados con la inhibición de diferentes proteín-quinasas como la quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK) y la proteín quinasa C (PKC).

Algunos flavonoides aislados, especialmente la antocianidina, delphinidina<sup>31</sup> y la flavona, crisina<sup>32</sup> originan relajaciones dependientes de endotelio y de óxido nítrico (NO). Estos efectos dependientes de endotelio están relacionados con un efecto pro-oxidante, ya que pueden ser inhibido por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que elevaría los niveles intracelulares de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, con el consiguiente aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> endotelial citosólico<sup>31</sup>. Algunos grupos han descrito también que los efectos de la

quercetina son parcialmente dependientes de endotelio y están relacionados con la liberación de factores relajantes derivados del endotelio<sup>33,34</sup>. Estos factores se liberan del endotelio en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generada por la quercetina por un mecanismo pro-oxidante<sup>34</sup>. Nosotros hemos observado también un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por quercetina en las arterias coronarias de rata<sup>35</sup>. La producción de ROS puede ser consecuencia de la auto-oxidación de la quercetina en el medio de incubación o por un evento específico que ocurre en las células vasculares. Sin embargo, nosotros no hemos observado hasta el momento que la quercetina produzca relajación dependiente de endotelio en las diferentes arterias estudiadas; una observación consistente con los datos recientes de otros grupos<sup>36</sup>. Además los metabolitos glucuronizados y sulfatados de quercetina carecen de efecto vasodilatador directo en la aorta de rata<sup>37</sup>. En la arteria coronaria de cerdo, la quercetina 3'-sulfato inhibe la contracción inducida por endotelina 1 (ET-1) y U-46619 (análogo del tromboxano A<sub>2</sub>) de forma independiente del endotelio, mientras que la quercetina 3-glucurónido era inactiva<sup>36</sup>. También hemos observado que la quercetina 3'-sulfato tiene efectos vasodilatadores agudos en arterias mesentéricas de resistencia de rata, pero de nuevo con una potencia inferior a la quercetina (observaciones no publicadas). Además, la incubación de arterias mesentéricas con quercetina 3-glucurónido durante 3 horas reduce la respuesta contractora de la fenilefrina<sup>38</sup>. Este efecto se suprime al inhibir la actividad glucuronidasa del tejido vascular, lo que sugiere que el metabolito sufre desconjugación en el tejido vascular y es la quercetina acumulada la responsable de este efecto. Estos datos indican que la conjugación de los flavonoides no es sólo una vía para facilitar su eliminación sino también una forma de transportar las geninas al tejido diana.

Relajaciones dependientes de endotelio se han observado en respuesta a una gran variedad de productos derivados de plantas, uvas, té y frutos<sup>39</sup> (fig. 3). Estas relajaciones inducidas por polifenoles, como la provocada por extractos de vino tinto en anillos aórticos, se reducen marcadamente por inhibidores de la eNOS y la guanilato ciclasa indicando la implicación del NO. Además, existen evidencias directas de que estos extractos estimulan la formación de NO en células endoteliales cultivadas y en arterias aisladas<sup>40,41,42</sup>. Los

flavonoides también pueden regular la actividad de la eNOS influyendo sobre su expresión génica y proteica, como demuestra el hecho de que la incubación a largo plazo de células endoteliales con polifenoles del vino o con antocianidina, aumentó la expresión de eNOS aunque la mayoría de los flavonoides no tuvieron efecto<sup>43</sup>.

En contraste con la quercetina y otros flavonoides, la miricetina provoca una respuesta contráctil dependiente del endotelio a través de un aumento en la producción de metabolitos vasoconstrictores derivados de la ciclooxigenasa<sup>44</sup>.

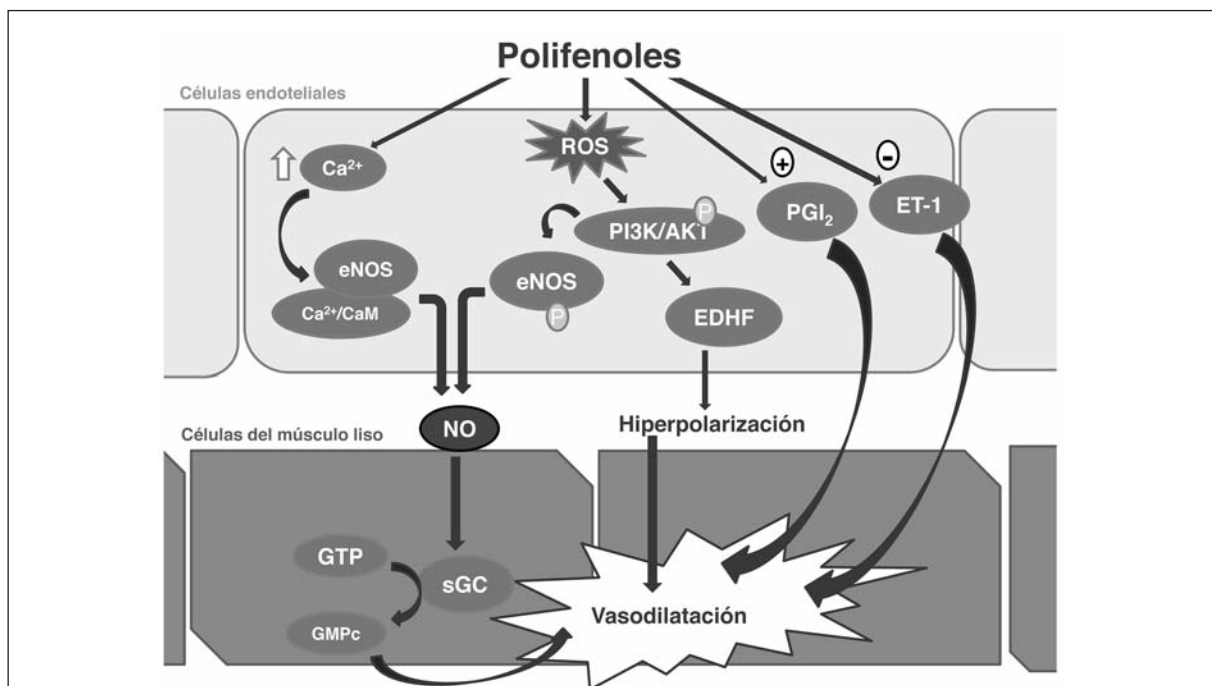
### Efectos antioxidantes

Los efectos beneficiosos de los flavonoides suelen atribuirse generalmente a su gran capacidad antioxidante. La quercetina y otros flavonoides son potentes captadores de ROS, como el O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, OH<sup>·</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a concentraciones micromolares<sup>45</sup>. También se ha demostrado que los glucurónidos de quercetina tienen propiedades antioxidantes<sup>46</sup>. Pero aparte de estas propiedades como captadores de ROS, los flavonoides son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de ROS, lo que puede ser aún más importante. Entre estas se incluyen la xantina oxidasa<sup>47</sup>, la ciclooxigenasa (COX)<sup>48</sup> y la NAD(P)H oxidasa de membrana en neutrófilos<sup>49</sup> y en CMLV<sup>50</sup>. También pueden estimular otras con capacidad antioxidante, como catalasa y SOD<sup>51</sup>. Al disminuir las concentraciones celulares de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> a través de estos mecanismos, los flavonoides protegen al NO y aumentan su actividad biológica.

Sin embargo, los flavonoides también pueden ser pro-oxidantes. La quercetina puede auto-oxidarse en soluciones acuosas y generar radicales libres<sup>52</sup>, además de disminuir los niveles de tioles intracelulares, como el glutatión. Pero este efecto pro-oxidante puede ser paradójicamente beneficioso, ya que podría jugar un papel positivo en la disfunción endotelial, porque la generación de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> en las células endoteliales puede estimular la señal del Ca<sup>2+</sup> y aumentar así la actividad eNOS y la liberación de EDHF<sup>53</sup>.

### Efectos sobre el óxido nítrico

Las acciones de la quercetina y otros polifenoles sobre el NO son muy complejas y las condicio-



**Figura 3.** Efectos agudos dependientes de endotelio de los polifenoles. Los polifenoles inducen relajaciones dependientes de endotelio inducidas por óxido nítrico (NO) en arterias aisladas. La activación de la NO sintasa endotelial (eNOS) se debe principalmente a: (a) un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y (b) una fosforilación de la eNOS mediante la vía PI3-cinasa/AKT. Además, los polifenoles causan relajaciones dependientes de endotelio de arterias aisladas mediadas por el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) de manera consecutiva a una formación controlada y localizada de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) que llevan a la activación de la vía PI3-cinasa/AKT. Los polifenoles también incrementan la liberación de prostaciclina endotelial ( $PGI_2$ ) e inhiben la síntesis y los efectos de la endotelina (ET)-1. Todos estos mecanismos contribuyen a explicar los efectos vasodilatadores, vasoprotectores y antihipertensivos de los polifenoles in vivo. El tratamiento a largo plazo de células endoteliales con polifenoles puede incrementar la expresión de eNOS.  $Ca^{2+}/CaM$ : complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina; sGC: guanilato ciclasa soluble.

nes de estrés oxidativo influyen fuertemente en su resultado. En sistemas libres de células, la quercetina puede ser oxidada por el oxígeno y generar  $O_2^-$ , el cual reacciona rápidamente con el NO inactivándolo<sup>52</sup>, un efecto que no es compartido por los metabolitos glucuronizados y sulfatados de quercetina<sup>54</sup>. En las células endoteliales, en ausencia de estrés oxidativo, se ha demostrado que la quercetina provoca un incremento rápido de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico, así como una estimulación dependiente de la dosis y del tiempo de la fosforilación de la eNOS, con un aumento concomitante de la producción de NO medido por quimioluminiscencia<sup>34</sup>. Por el contrario, cuando la producción de NO se determina por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, la quercetina no aumenta el NO en las células endoteliales<sup>41</sup>. También se han descrito efectos inhibitorios sobre la actividad eNOS inducidos por quercetina en células endoteliales bovinas<sup>55</sup>. Por lo tanto, en ausencia de estrés oxidativo, se puede observar tanto el

aumento como la disminución de la producción de NO.

Por el contrario, en condiciones de alto nivel de  $O_2^-$  y por lo tanto, de acelerado metabolismo de NO, la quercetina puede proteger a dicho NO de diferentes maneras. En primer lugar, en los sistemas libres de células, cuando el  $O_2^-$  está incrementado enzimática o químicamente, la quercetina puede captar al  $O_2^-$  y esto protege al NO<sup>52</sup>. En segundo lugar, en las células, la quercetina puede no sólo captar al  $O_2^-$ , sino también inhibir su fuente enzimática, como por ejemplo, la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa<sup>49,56</sup>. Los metabolitos glucuronizados y sulfatados pueden prevenir, aunque menos efectivamente que la quercetina, el deterioro de la biodisponibilidad de NO en condiciones de alto estrés oxidativo<sup>37</sup>. En tercer lugar, debido a sus propiedades antioxidantes, los flavonoides pueden evitar potencialmente la oxidación del  $BH_4$  y el desacoplamiento de la eNOS<sup>57</sup>, que conduce a este enzima a la

producción de  $O_2^-$  en lugar de NO. Finalmente, la quercetina puede inhibir las vías de señalización que conducen a la inducción de la  $p47^{phox}$ , una subunidad citosólica de la NADPH oxidasa que se transloca a la membrana y aumenta la actividad de la subunidad catalítica membranaral (NOX). Así, la quercetina puede prevenir el deterioro de la biodisponibilidad de NO inducido por la angiotensina II (Ang-II)<sup>58</sup> y la ET-1<sup>57,59</sup>. El efecto preventivo de la quercetina en la disfunción endotelial inducida por ET-1 parece estar relacionado con la regulación a la baja de la  $p47^{phox}$  a través de la inhibición de la proteína quinasa C (PKC)<sup>57</sup>. El metabolito quercetina 3-glucurónido también previene la disfunción endotelial inducida por ET-1<sup>57</sup>. Además, la quercetina *in vitro* también restauró el deterioro de la función endotelial en arterias de ratas hipertensas (SHR)<sup>30</sup> y diabéticas<sup>60</sup>. *In vivo*, una alta dosis de quercetina añadida a la dieta llevó al aumento de la actividad NOS en la pared aórtica de ratas sanas, sin cambios en la expresión de la eNOS, lo cual fue acompañado por un aumento en la relajación dependiente de endotelio<sup>61</sup>. En hombres sanos, la quercetina incrementa la concentración plasmática de S-nitrosotioles, los nitritos plasmáticos y los nitratos urinarios, lo que indirectamente apunta a un aumento del NO endotelial<sup>62</sup>. Sin embargo, la quercetina aún puede inducir efectos antihipertensivos *in vivo*, cuando la síntesis del NO está inhibida (en el modelo L-NAME de hipertensión, como veremos más abajo), lo que sugiere la participación de mecanismos independientes de NO.

Las células endoteliales son lugares donde se metabolizan los flavonoides. Se ha descrito que estas células producen la O-metilación de la epicatequina, vía catecol-O-metiltransferasa, convirtiendo a este flavanol en una mezcla de 3'-O-metil y 4'-O-metil epicatequina<sup>63</sup>, que se acumulan en el citosol e inhiben con mayor potencia que el flavanol «madre» la producción de  $O_2^-$  a través de la NADPH oxidasa.

El NO ejerce sus efectos vasodilatadores mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble en células de músculo liso vascular y el consiguiente aumento del guanosín monofosfato cíclico (cGMP). A su vez, el cGMP es metabolizado por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) y, por lo tanto, la actividad NOS y la relajación dependiente de endotelio son altamente dependientes de la actividad de la

PDE. Por lo tanto, los inhibidores de la PDE pueden prevenir la disfunción endotelial en algunas circunstancias<sup>64</sup>. Se ha observado que varios flavonoides son capaces de inhibir distintas isoformas de la PDE<sup>65</sup>. Por lo tanto, la inhibición de las PDEs puede representar otro mecanismo potencial de los flavonoides en la prevención de la disfunción endotelial.

### Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF)

Además del NO, el EDHF es otro regulador importante en la función vascular, especialmente en arterias de resistencia. La naturaleza del EDHF, dependiendo del tipo de arteria considerada, se ha propuesto que puede ser el ácido epoxi-eicosatrienoico (EET), el potasio o el  $H_2O_2$  y la hiperpolarización de las células del músculo liso puede también ser transmitida desde las células endoteliales a través de las uniones mioendoteliales<sup>66</sup>. Recientemente, se ha observado que los efectos vasodilatadores de la quercetina son inhibidos por la charybdotoxina, un bloqueante de los canales de  $K^+$  de conductancia intermedia (IKCa) y larga (BKCa)<sup>34</sup>. Los autores concluyen que la quercetina libera EDHF, cuya actividad depende de la activación de canales de  $K^+$ . También se ha descrito la participación del EDHF en las relajaciones producidas por extractos polifenólicos de vino tinto en arterias coronarias<sup>67</sup>. Por último, parte de las respuestas relajantes independientes del endotelio inducidas por quercetina pueden ser atribuidas a una activación de los canales BKCa directamente en células de músculo liso arteriales<sup>35</sup>.

### Efectos sobre endotelina-1

La ET-1 es un potente vasoconstrictor liberado por las células endoteliales. La disfunción endotelial está asociada con una elevación de los niveles de ET-1<sup>68</sup>. Por otra parte, la ET-1 es capaz de inducir disfunción endotelial. La quercetina y otros polifenoles reducen la cantidad de ET-1 liberada por células endoteliales de venas umbilicales humanas y células endoteliales aórticas bovinas<sup>69,70</sup>. *In vivo*, la quercetina también reduce la cantidad de ET-1 urinaria en ratones «knock-out» en la proteína ApoE<sup>1</sup> y en hombres sanos<sup>62</sup>. Aunque no hay datos disponibles de los efectos *in vivo* otros flavonoides aislados sobre la



producción de ET-1, nuestro equipo ha demostrado recientemente que la administración crónica de los polifenoles del vino tinto disminuyen los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas con hipertensión DOCA-sal<sup>72</sup>.

### Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales y células musculares lisas vasculares

La apoptosis de células endoteliales evidentemente influye sobre la permeabilidad del endotelio vascular, lo que puede facilitar el desarrollo de diversas patologías. Los flavonoides han demostrado tener un doble efecto en la apoptosis de estas células, ya que pueden ejercer efectos antiapoptóticos o proapoptóticos, para mantener la adecuada integridad y funcionalidad del endotelio.

*In vitro*, ejercen efectos que protegen de la apoptosis mediada por LDL oxidadas y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células endoteliales de aorta bovina y fibroblastos<sup>73</sup>, lo que parece estar relacionado con la homeostasis del calcio. También otro flavonoide del vino, delphinidina, protege a las células endoteliales de la apoptosis<sup>74</sup>.

Por el contrario, se ha observado que algunos flavonoides promueven la apoptosis de células tumorales<sup>75</sup>, y pueden modular el nivel de expresión de proteínas protectoras (Bcl-2, Bxl-xL, A1) o factores proapoptóticos (Bax, Bid, Bak)<sup>76</sup>.

Hay pocos estudios sobre los efectos de los flavonoides en la proliferación endotelial, aunque en general se consideran inhibidores de este proceso. Tanto quercetina, resveratrol como delphinidina han mostrado ser inhibidores de este proceso<sup>77,78</sup>. Cabe mencionar que la quercetina inhibe la proliferación endotelial y la migración y formación del tubo<sup>55,78,79</sup>. Este efecto está asociado con una disminución en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y puede resultar en una reducción de la angiogénesis *in vivo*<sup>80</sup>. Por lo tanto, podría desempeñar un papel en los efectos quimiopreventivos de la quercetina contra los tumores sólidos.

Muchos estudios han demostrado que la quercetina y su conjugado con glucurónido inhiben la proliferación y la hipertrofia o inducen la apoptosis en células del músculo liso vascular en cul-

tivo<sup>81,82,83</sup>. Los efectos inhibidores de la quercetina sobre la síntesis del ADN en células del músculo liso vascular estimuladas por TNF- $\alpha$  parecen estar relacionados con la reducción de la actividad de quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK1/2), una quinasa que juega un papel muy importante en la proliferación y diferenciación celular<sup>81</sup>. En células del músculo liso vascular estimuladas por Ang II y en células del músculo liso vascular con un fenotipo íntimal<sup>82</sup>, la quercetina inhibe la hipertrofia mediante la disminución de la vía de la quinasa Jun-N terminal (JNK)<sup>82,83</sup>. Estos efectos también pueden explicar el efecto antihipertensivo y antiaterosclerótico de la quercetina.

### Sobre la función endotelial en la hipertensión

La elevación de la presión arterial es un factor importante y común en las principales enfermedades cardiovasculares, como enfermedad coronaria, infarto cerebral, enfermedad arterial periférica, enfermedad renal e insuficiencia cardíaca<sup>84</sup>. Es bien conocido el efecto antihipertensivo de la dieta rica en frutas y verduras en pacientes hipertensos<sup>17</sup>, y se ha atribuido principalmente a los antioxidantes presentes en estos alimentos, entre los que abunda, como hemos visto, quercetina.

Los animales hipertensos, al igual que los pacientes hipertensos esenciales, desarrollan una reducción en la vasodilatación dependiente de endotelio y NO. En diferentes modelos experimentales de hipertensión (ratas espontáneamente hipertensas (SHR), DOCA-sal y ratas Goldblatt), el tratamiento crónico con quercetina restauró el deterioro de la función vasodilatadora endotelial medida por la respuesta relajante a acetilcolina<sup>16,85,86,87,88</sup>. Todos estos modelos se asociaron con un aumento plasmático, vascular y hepático del estado oxidativo que fue reducido de forma constante por la quercetina. En conjunto, estos resultados sugieren un papel protector de quercetina *in vivo* sobre la inactivación del NO inducida por O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Además, en SHR donde se detecta una regulación al alza de la expresión proteica eNOS, pero con una reducción paradójica de la actividad eNOS comparada con sus controles normotensos WKY, la quercetina normaliza ambos parámetros<sup>87</sup>. Como se mencionó anteriormente para los experimentos *in*

*in vitro* con Ang II y ET-1, en SHR la quercetina puede prevenir la sobreexpresión de p47<sup>phox</sup><sup>87</sup>. Por otra parte, el tratamiento crónico con quercetina también reduce distintos marcadores de disfunción endotelial en ratones «knockout» para la proteína ApoE<sup>71</sup> y en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y en sacarosa<sup>89</sup>.

Al contrario que para la vasodilatación dependiente de endotelio provocada por acetilcolina, la relajación dependiente de endotelio inducida por insulina, que también está reducida en SHR, no se ve afectada tras el tratamiento crónico con quercetina<sup>88</sup>. El diferente perfil de actuación de la quercetina en la relajación inducida por estos dos agentes liberadores de NO endotelial, podría estar relacionado con las diferentes vías que emplean la acetilcolina y la insulina en la activación de la eNOS. La acetilcolina es un agonista colinérgico clásico que activa la eNOS por un mecanismo dependiente de calcio. Sin embargo, la insulina tiene unas acciones vasodilatadoras independientes de calcio, que están mediadas por un mecanismo dependiente de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3-K), con la participación de la Akt, que a su vez, provoca la fosforilación de la eNOS<sup>90</sup>. La activación de la Akt y la fosforilación de la eNOS estimulada por la insulina, se encuentra reducida en anillos aórticos de ratas SHR y WKY tratadas crónicamente con quercetina. Este efecto puede estar relacionado con un efecto inhibitorio directo de la quercetina sobre la PI3-K<sup>83</sup>.

Además, los cambios en la vasodilatación dependiente de endotelio pueden ocurrir como consecuencia la reducción en la liberación de prostanoides vasoconstrictores derivados del endotelio. La quercetina de forma crónica no modificó la vasoconstricción dependiente de endotelio en SHR<sup>16</sup>, pero la inhibió marcadamente en ratas deficientes en NO<sup>91</sup> y en ratas Goldblatt<sup>86</sup>.

Las sirtuinas Sir2 y su análogo en mamíferos SIRT1 han sido implicadas en el aumento de la esperanza de vida inducida por la restricción calórica<sup>92</sup>, y más recientemente en la prevención de la senescencia vascular<sup>93</sup>. La activación de las SIRT1 ha demostrado promover la vasodilatación dependiente del endotelio<sup>94</sup> y regular hacia la baja la expresión del receptor para Ang II<sup>95</sup>. El descubrimiento del papel de las sirtuinas en el estrés oxidativo y en la esperanza de vida

ha llevado a un área nueva y fascinante de la investigación en el campo de los polifenoles, ya que algunos polifenoles como la quercetina y el resveratrol pueden activar las sirtuinas<sup>96</sup>. De hecho, la quercetina incrementa la esperanza de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y del gusano *Caenorhabditis elegans*<sup>97</sup>.

## >> FLAVONOIDES Y PLAQUETAS

Los efectos como antiagregantes plaquetarios de los flavonoles fueron inicialmente descritos por Beretz *et al.*<sup>98</sup>. Se sugirió inicialmente que estos efectos se deben a sus efectos inhibitorios sobre fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y por lo tanto, a un aumento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Gryglewski *et al.*<sup>99</sup> describieron las acciones de los flavonoides como captadores de anión superóxido en las plaquetas, lo que podría «resucitar la biosíntesis y la acción de las prostaciclina endoteliales y del factor relajante dependiente de endotelio», y contribuir a sus efectos antitrombóticos. Más tarde, se descubrió que la quercetina inhibía la activación de la NADPH oxidasa dependiente de PKC en las plaquetas<sup>100</sup>. Y más recientemente, los efectos antiagregantes han sido asociados con el bloqueo de la actividad de la quinasa Fyn y de la fosforilación de la tirosina de Syk y de la fosfolipasa C $\gamma$ <sup>101</sup>. Sin embargo, los efectos antiagregantes *in vivo* de la quercetina han sido cuestionados. En un estudio en humanos con cebollas que proporcionaban 114 mg de quercetina/día no se encontraron cambios en la agregación plaquetaria, en la producción de tromboxano B<sub>2</sub>, factor VII u otras variables hemostáticas<sup>102</sup>.

## >> FLAVONOIDES E HIPERTENSIÓN

El primer informe sobre los efectos antihipertensivos de la quercetina se realizó en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), un modelo genético de hipertensión multifactorial<sup>26</sup>. Este estudio fue confirmado y ampliado por otros<sup>87,88,103,104</sup> y en otros modelos experimentales clásicos de hipertensión experimental<sup>74,85,86,91,105,106</sup>. Además, la quercetina también redujo la presión arterial en modelos animales con resistencia a la insulina y síndrome metabólico tales como las ratas Zucker obesas<sup>107</sup> y en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y rica en sacarosa<sup>89</sup>. Curiosamente, la reducción de la presión arterial es de larga

duración, permaneciendo por lo menos después de 48 horas de la interrupción del tratamiento. Sorprendentemente, la quercetina fue eficaz en todos los modelos de hipertensión analizados, independientemente del origen de la hipertensión, del estado del sistema renina-angiotensina, del estrés oxidativo, del óxido nítrico y de otros factores. Sin embargo, la quercetina no ejerce efectos hipotensores, es decir, no tiene ningún efecto en los animales normotensos.

De acuerdo con la llamada «hipótesis de Barker», fuertemente apoyada por los estudios epidemiológicos en humanos y animales, muchas enfermedades crónicas en adultos, incluyendo la diabetes tipo 2, la obesidad y la hipertensión, pueden tener su origen en la vida del feto debido a los cambios en la programación genética<sup>108</sup>. Así, los descendientes adultos de las ratas o ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante el embarazo mostraron hiperglucemia adulta, resistencia a la insulina, obesidad e hipertensión, a pesar de ser alimentados con una dieta estándar durante toda la vida postnatal<sup>109</sup>. Recientemente, un estudio muy interesante<sup>110</sup> mostró que estos efectos se redujeron en los ratones alimentados con dieta suplementada con quercetina durante el embarazo. Estos resultados sugieren que la quercetina puede evitar la programación epigenética durante la vida prenatal.

Una presión arterial elevada mantenida en el tiempo es uno de los determinantes más poderosos en el desarrollo de las enfermedades cardíacas, vasculares y renales. La mayoría de los beneficios del tratamiento antihipertensivo en el daño de órganos diana son el resultado de la bajada de la presión arterial per se y son, en gran medida, independientes del tipo de fármaco empleado<sup>111</sup>. La quercetina ha demostrado una reducción de la hipertrofia ventricular izquierda y efectos protectores sobre la estructura y la función renal en los distintos modelos animales de hipertensión estudiados. El efecto protector sobre la función endotelial en estos modelos animales se han mencionado anteriormente.

Recientemente se han publicado dos ensayos aleatorizados, a doble ciego, controlados con placebo, ensayos clínicos cruzados, que analizan los efectos de la quercetina en la presión arterial. En el estudio de Edwards *et al.*<sup>112</sup>, los pacientes con hipertensión estadio 1 tuvieron una reduc-

ción en la presión arterial sistólica, diastólica y media después del tratamiento con quercetina, pero el flavonol no tuvo efectos significativos sobre los pacientes pre-hipertensos. En el estudio de Egert *et al.*<sup>113</sup> los pacientes con síndrome metabólico fueron clasificados de acuerdo con sus fenotipos ApoE. La quercetina redujo la presión arterial sistólica en el grupo ApoE3, mientras que no fueron observados efectos significativos en los pacientes con el fenotipo ApoE4. En otro estudio, llevado a cabo en voluntarios sanos<sup>114</sup> el consumo de quercetina no modificó significativamente algunos factores de riesgo cardiovascular incluyendo la presión arterial. No obstante, esta falta de efecto en los seres humanos sanos, no es sorprendente dada la falta de efecto de la quercetina en animales sanos como se ha descrito anteriormente.

## >> FLAVONOIDES Y ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial caracterizada por el engrosamiento de la pared arterial, causado por el depósito de materiales grasos durante muchos años. Los síntomas se manifiestan de forma aguda en las últimas etapas de la enfermedad. La alteración en el perfil lipídico sérico es un evento temprano y crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. El estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial se asocian con la patogenia de la aterosclerosis.

El consumo de bajas dosis de quercetina reduce la progresión de la aterosclerosis en ratones deficientes de ApoE<sup>71,115</sup>. Curiosamente la quercetina fue más efectiva que otros flavonoides representativos [epicatequina (3-flavanol), teaflavina (dímero de catequina)] y otros polifenoles [sesamina (lignano), o ácido clorogénico (ácido fenólico)]<sup>71</sup>. Los flavonoles pueden proteger contra la aterosclerosis mediante la prevención de uno o varios de los procesos implicados en la progresión de la enfermedad tales como el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial. La mayoría de los estudios han demostrado que la quercetina no tiene ningún efecto beneficioso en el perfil lipídico plasmático. Así, el colesterol plasmático LDL o HDL no está modificado en ratones «knockout» ApoE<sup>115</sup>, en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y rica en sacarina<sup>89</sup> o en humanos con sobrepeso con un fenotipo ApoE3 y puede incluso reducir la pro-

porción HDL/LDL en portadores de ApoE4<sup>113</sup>. Por el contrario, se ha demostrado que reduce los niveles de triglicéridos y colesterol séricos en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol<sup>116</sup>. Además de los efectos sobre los lípidos plasmáticos, la quercetina inhibe los pasos cruciales en el desarrollo de la aterosclerosis como la susceptibilidad del colesterol LDL a la oxidación<sup>115,117</sup>, la citotoxicidad inducida por el LDL<sup>118</sup> y la formación de estrías grasas aórticas<sup>119</sup>. Curiosamente, los metabolitos de quercetina se acumulan en las lesiones ateroscleróticas humanas, pero no en las aortas normales<sup>120</sup>. La quercetina también redujo significativamente el contenido aórtico de isoprostanos, el superóxido vascular, los leucotrienos B<sub>4</sub> vasculares, y las concentraciones plasmáticas de selectina P, y aumentó el NO y la hemo-oxigenasa 1 en ratones ApoE -/-<sup>71</sup>. Las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas de la matriz son proteínas clave para varios procesos implicados en la formación de la placa aterosclerótica como la infiltración de las células inflamadas. La quercetina es capaz de reducir el aumento que provoca el TNF $\alpha$  en la expresión proteica de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1 en células de músculo liso vascular y endoteliales humanas. Sin embargo, los metabolitos de quercetina, quercetina 3-glucurónido, quercetina 3'-sulfato e isorhamnetina 3-glucurónido, no tuvieron casi efecto<sup>121,122</sup>. El efecto inhibitorio en la expresión de ICAM-1 ocurre a través de una regulación a la baja de la vía JNK/AP-1<sup>123</sup>. Además, la quercetina también puede preservar la actividad de las paraoxonasas séricas humanas (PON1)<sup>124</sup> e incrementar su expresión<sup>125</sup>, un mecanismo adicional que permite proteger a las LDL de la oxidación y desempeñar un papel protector en la aterosclerosis. Sin embargo, los efectos de los flavonoides aislados en el desarrollo de la aterosclerosis en humanos no han sido abordados.

Los mecanismos moleculares por los cuales la quercetina puede antagonizar la expresión de genes inflamatorios no han sido totalmente clarificados. La quercetina y otros flavonoides inhiben la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$ , así como la expresión de la NOS inducible (iNOS) y la producción de NO en macrófagos activados por lipopolisacárido (LPS), mediante la inhibición de la vía del factor nuclear NF B, a través de la reducción de la fosforilación de IKB-<sup>125</sup>. Recientemente se ha descrito

que las propiedades antiinflamatorias de quercetin e isorramnetina en macrófagos RAW264.7 también se acompañan de un incremento en la expresión proteica de hemo-oxigenasa 1, a través de la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2<sup>127</sup>. Además, el microRNA-155, que posee carácter proinflamatorio, es regulado a la baja por quercetina e isorramnetina pero no por quercetina-3-glucurónido.

## >> FLAVONOIDES E ISQUEMIA CARDÍACA

Las enfermedades coronarias crónicas y los síndromes coronarios agudos implican múltiples alteraciones en la reactividad vascular, la estructura vascular y las interacciones entre la pared de los vasos y los elementos de la circulación sanguínea.

La hipertensión y la aterosclerosis son los principales factores de riesgo para el infarto de miocardio y existen muchas evidencias que indican que la reducción del colesterol LDL, de las lesiones arteroscleróticas y de la presión arterial produce una dramática disminución del riesgo de las enfermedades coronarias<sup>111</sup>. Adicionalmente, la disfunción endotelial es un factor pronóstico independiente para el infarto de miocardio<sup>22,23</sup>. Los flavonoides al prevenir de la hipertensión, la arteriosclerosis y la disfunción endotelial, como se ha mencionado anteriormente, pueden proteger las arterias coronarias a largo plazo.

La mayor parte de los eventos coronarios ocurren como consecuencia de la ruptura de una placa aterosclerótica, la formación de un trombo y la posterior isquemia cardíaca. La degradación del colágeno intersticial, que confiere resistencia biomecánica a la placa fibrosa, por las metaloproteínas de la matriz (MMPs), parece estar involucrada en la inestabilidad y la ruptura de dicha placa. La quercetina reduce la expresión de las metaloproteínas de la matriz (MMP-2 y MMP-9)<sup>128</sup> y puede ayudar en la estabilización de la placa de ateroma<sup>129</sup>. Los vasoespasmos coronarios pueden también contribuir a la alteración aguda del flujo arterial. Los flavonoides por sus efectos como antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores pueden también proporcionar beneficios adicionales protectores en la fase aguda. Durante el evento isquémico y la perfusión eventual post-isquemia hay un proceso inflamatorio agudo con la liberación de

múltiples citoquinas y ROS. La reperfusión post-isquemia que ocurre en las enfermedades coronarias se asocia generalmente a una reducción de la producción endógena de NO resultante de la disfunción endotelial y el daño tisular debida a la infiltración de neutrófilos. Estudios experimentales en modelos animales en los que la isquemia se induce agudamente por la ligadura de la arteria coronaria o por infusión de isoproterenol han demostrado que la quercetina reduce la disfunción contráctil del corazón, el tamaño del infarto y el patrón de cambios en la expresión proteica (incluyendo iNOS y COX2) inducidos por la isquemia cardíaca<sup>130,131,132,133</sup>. Estos efectos pueden ser observados después de la ingesta de quercetina *in vivo* y *ex vivo*. La mayoría de los estudios asocian el efecto protector en el corazón con los efectos antioxidantes de la quercetina. La capacidad de los flavonoides para proteger al NO probablemente juega un papel crucial en la prevención de la isquemia.

## >>FLAVONOIDES Y ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

La primera causa de accidente cerebrovascular es la interrupción del flujo sanguíneo cerebral ocurrido durante la obstrucción vascular por tromboembolismo o por trombosis local. Los procesos patofisiológicos en el accidente cerebrovascular son complejos y dependen de la gravedad, duración y localización del daño isquémico en el cerebro. Los principales factores de riesgo que conducen a la aparición de accidentes cerebrovasculares son la hipertensión, la aterosclerosis, el colesterol LDL, la diabetes y la fibrilación atrial. Los flavonoides se han propuesto como eficaces agentes preventivos y como opciones de tratamiento en la fase aguda del ictus<sup>134</sup>. Como se ha descrito anteriormente, los flavonoides previenen la disfunción endotelial, la aterosclerosis, la hipertensión, y posiblemente la trombosis, todos mecanismos potenciales para prevenir los accidentes cerebrovasculares. Con respecto al tratamiento agudo, los flavonoides podrán actuar en diferentes fases del ictus cerebral. Para la fase aguda, los flavonoides mejoran el flujo sanguíneo cerebral, previenen la agregación plaquetaria y la trombosis, reducen la excitotoxicidad e inhiben el estrés oxidativo. Para la fase intermedia, los flavonoides reducen la inflamación y protegen la integridad endotelial. Para la fase final, los flavonoides

interfieren con los mecanismos de muerte celular inducida por isquemia como la apoptosis y la necrosis<sup>135</sup>.

## >>CONCLUSIONES

Los flavonoides, y especialmente la quercetina, están ampliamente distribuidos en plantas y están presentes en cantidades considerable en frutas y verduras. Además de sus efectos antioxidantes, hay un impresionante número de enzimas cuya actividad es modulada (en su mayoría inhibida) por ellos. Por lo tanto, se puede predecir que un gran número de vías de señalización bioquímicas y, por tanto, procesos fisiológicos y patológicos, pueden verse afectados. Es sorprendente que la quercetina es todavía considerada únicamente como un antioxidante, e incluso más sorprendente que a menudo es utilizada como una herramienta farmacológica para «específicamente» inhibir una enzima determinada. Potencialmente puede interactuar con muchas dianas moleculares conocidas, involucradas en la fisiopatología de la enfermedad isquémica y en el accidente cerebrovascular, actuando por múltiples mecanismos, que operan tanto en la prevención a largo plazo como en la fase aguda de eventos cardiovasculares. Estas interacciones múltiples a menudo van en la dirección correcta y explican los efectos protectores sobre la enfermedad cardiovascular, pero ocasionalmente pueden dar lugar a efectos perjudiciales.

Para resumir, hay evidencias sólidas de que, *in vitro*, la quercetina y flavonoides relacionados ejercen: 1) efectos vasodilatadores dependientes e independientes del endotelio, 2) efecto protector sobre el óxido nítrico y la función endotelial bajo condiciones de estrés oxidativo, 3) efectos antiagregantes plaquetarios, 4) inhibición de la oxidación de LDL, 5) reducción de las moléculas de adhesión y otros marcadores inflamatorios y 6) prevención en el daño neuronal oxidativo e inflamatorio. Los efectos *in vitro* sobre la producción de NO en arterias sana son controvertidos y dependen del flavonoide utilizado. Los metabolitos de quercetina muestran un efecto protector parcial sobre la función endotelial y la oxidación del colesterol LDL. En modelos animales, la quercetina produce indiscutibles efectos antihipertensivos y antiaterogénicos, previene la disfunción endotelial y protege el miocar-

dio del daño isquémico. No tiene efectos claros en el perfil lipídico sérico. En humanos con flavonoles aislados demuestran un efecto antihipertensivo, mientras que no hay datos disponibles sobre la función endotelial, la resistencia a la insulina y la aterosclerosis. Algunas evidencias también indican efectos diferenciales en función de los antecedentes genéticos de los pacientes. El metaanálisis de estudios epidemio-

lógicos demuestra una asociación inversa entre el consumo de flavonoles (junto con flavonas) y la enfermedad coronaria y los accidentes cerebrovasculares. Por lo tanto, aunque todavía no hay pruebas sólidas, importantes evidencias sugieren que los flavonoides pueden prevenir las formas más comunes de enfermedad cardiovascular, contribuyendo a los efectos protectores asociados al consumo de frutas y verduras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rice-Evans A, Packer L. Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc. New York. 1998.
2. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002; 17: 271-278.
3. Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. CRC Press. Boca Raton, FL. 1990.
4. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy Ch, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
5. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957: 21-36.
6. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 2004; 134: 613-617.
7. Gotti R, Furlanetto S, Lanteri S, Olmo S, Ragaini A, Cavrini V. Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content. *Electrophoresis* 2009; 30: 2922-2930.
8. Carando S, Teissedre PL, Pascual-Martinez L, Cabanis JC. Levels of flavan-3-ols in French wines. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4161-4166.
9. Schroeter H, Heiss C, Balzer J et al. (-)-epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1024-1029.
10. Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 895-909.
11. de Pascual-Teresa S, Moreno DA, García-Viguera C. Flavonols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 1679-1703.
12. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 880-886.
13. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
14. Hertog MGL, Hollman PCH, Putte van de B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1996; 41: 1242-1246.
15. Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 904-908.
16. Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 117-124.
17. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med* 1997; 33: 1117-1124.
18. Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* 2003; 63: 71-100.
19. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 15-21.
20. Bieger J, Cermak R, Blank R et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr* 2008; 138: 1417-1420.
21. Lee-Hilz YY, Stolaki M, van Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2128-2134.

22. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906.
23. Widlansky ME, Gokce N, Keane JF, Jr Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-1160.
24. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006; 40: 1054-1065.
25. Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993; 239: 1-7.
26. Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 857-862.
27. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993; 265: H774-778.
28. Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A et al. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med* 2002; 68: 307-310.
29. Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo A et al. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 66-72.
30. Ibarra M, Moreno L, Vera R et al. Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. *Planta Med* 2003; 69: 995-1000.
31. Andriambelosen E, Magnier C, Haan-Archipoff G et al. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* 1998; 128: 2324-2333.
32. Duarte J, Jimenez R, Villar IC, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamargo J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Med* 2001; 67: 567-569.
33. Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; 74: 603-612.
34. Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L et al. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 339-347.
35. Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM et al. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 424-431.
36. Suri S, Liu XH, Rayment S et al. Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 566-575.
37. Lodi F, Jimenez R, Moreno L et al. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 2009; 204: 34-39.
38. Pérez-Vizcaino F, Galindo P, Rodriguez-Gomez I, et al. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. 4th International Conference on Polyphenols and Health. Abstract book O44, Pág. 91. 2009.
39. Schini-Kerth VB, Auger C, Etienne-Selloum N, Chataigneau T. Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF. *Adv Pharmacol* 2010; 60: 133-175.
40. Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J* 2005; 19: 455-457.
41. Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambelosen E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 535-540.
42. Auger C, Chaabi M, Anselm E, Lobstein A, Schini-Kerth VB. The red wine extract-induced activation of endothelial nitric oxide synthase is mediated by a great variety of polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54 Suppl 2: S171-183.
43. Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol* 2003; 41: 471-478.
44. Jimenez R, Andriambelosen E, Duarte J et al. Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1539-1544.
45. Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1127-1237.
46. Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1274-1285.

47. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 1993; 13: 2165-2170.
48. Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents actions* 1991; 32: 283-288.
49. Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1367-1369.
50. Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, et al. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 544: 97-103.
51. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytoter Res* 1999; 13: 393-396.
52. Lopez-Lopez G, Moreno L, Cogolludo A et al. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 851-859.
53. Duarte J, Andriambelosen E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res* 2004; 53: 595-602.
54. Lodi F, Jimenez R, Menendez C, Needs PW, Duarte J, Perez-Vizcaino F. Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med* 2008; 74: 741-746.
55. Jackson SJ, Venema RC. Quercetin inhibits eNOS, microtubule polymerization, and mitotic progression in bovine aortic endothelial cells. *J Nutr* 2006; 136: 1178-1184.
56. Busse WW, Kopp DE, Middleton E Jr. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 801-809.
57. Romero M, Jimenez R, Sanchez M et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2009; 202: 58-67.
58. Sanchez M, Lodi F, Vera R et al. Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr* 2007; 137: 910-915.
59. Romero M, Jiménez R, Sánchez M et al. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis* 2010; 212: 78-85.
60. Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 1-7.
61. Benito S, Lopez D, Saiz MP et al. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 910-916.
62. Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 1018-1025.
63. Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2008; 469: 209-219.
64. Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 2004; 17: 1040-1044.
65. Picq M, Dubois M, Prigent AF, Nemoz G, Pacheco H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem Int* 1989; 18: 47-57.
66. Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117: 139-155.
67. Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 1131-1136.
68. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 508-531.
69. Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103 Suppl 48: 72S-75S.
70. Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 279-285.
71. Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM et al. Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 749-757.



72. Jiménez R, López-Sepúlveda R, Kadmiri M et al. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 462-473.
73. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O et al. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 565-573.
74. Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1095-1102.
75. Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 6337-6346.
76. Nam S, Smith DM, Dou QP. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1083-1088.
77. Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R, Lugnier C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 479-487.
78. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 2001; 171: 11-16.
79. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 643-651.
80. Luo H, Jiang BH, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer* 2008; 60: 800-809.
81. Moon SK, Cho GO, Jung SY et al. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 1069-1078.
82. Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F et al. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 919-925.
83. Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzuki Y et al. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1458-1465.
84. Kannel WB. Risk stratification in hypertension: New insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens* 2000; 13: 3S-10S.
85. Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R et al. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 2004; 70: 334-341.
86. Garcia-Saura MF, Galisteo M, Villar, IC et al. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 2005; 270: 147-155.
87. Sanchez M, Galisteo M, Vera R et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006; 24: 75-84.
88. Romero M, Jimenez R, Hurtado B et al. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 627: 242-250.
89. Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 933-939.
90. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001; 276: 30392-30398.
91. Duarte J, Jimenez R, O'Valle F et al. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens* 2002; 20: 1843-1854.
92. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 305: 390-392.
93. Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y et al. SIRT1/eNOS Axis as a Potential Target against Vascular Senescence, Dysfunction and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 431-435.
94. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14855-14860.
95. Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T et al. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1263-1269.
96. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191-196.
97. Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 2009; 10: 565-578.

98. Beretz A, Cazenave JP, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions* 1982; 12: 382-387.
99. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 317-322.
100. Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* 2006; 20: 1082-1089.
101. Wright B, Moraes LA, Kemp CF et al. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 1312-1325.
102. Janssen K, Mensink RP, Cox FJ et al. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 255-262.
103. Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2007; 137: 628-633.
104. Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 36-40.
105. Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 892-896.
106. Jalili T, Carlstrom J, Kim S et al. Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 531-541.
107. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2081-2087.
108. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 115-128.
109. Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism* 2005; 54: 500-507.
110. Liang C, Oest ME, Prater MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009; 86: 377-384.
111. Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet* 2003; 362: 1527-1535.
112. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 2007; 137: 2405-2411.
113. Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Muller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr* 2010; 140: 278-284.
114. Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 1998; 128: 593-597.
115. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2744-2752.
116. Kamada C, da Silva EL, Ohnishi-Kameyama M, Moon JH, Terao J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res* 2005; 39: 185-194.
117. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341: 454-457.
118. Negre-Salvayre A, Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 101-106.
119. Auger C, Teissedre PL, Gerain P et al. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 2015-2021.
120. Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 2008; 283: 9424-9434.
121. Tribolo S, Lodi F, Connor C et al. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2008; 197: 50-56.
122. Winterbone MS, Tribolo S, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2009; 202: 431-438.

123. Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J Physiol* 1999; 277: C403-411.
124. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 892-904.
125. Gong M, Garige M, Varatharajulu R et al. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 1001-1004.
126. Comalada M, Ballester I, Bailón E et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1010-1021.
127. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE et al. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem*. 2011; 22: 293-299.
128. Huang YT, Hwang JJ, Lee PP et al. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 999-1010.
129. Motoyama K, Koyama H, Moriwaki M et al. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. *Nutrition* 2009; 25: 421-427.
130. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1365-1374.
131. Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1220-1228.
132. Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci* 2010; 86: 178-184.
133. Wan LL, Xia J, Ye D, Liu J, Chen J, Wang G. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 28-33.
134. Simonyi A, Wang Q, Miller RL et al. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2005; 31: 135-147.
135. Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res* 2008; 13: 265-279.
136. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312: 478-481.
137. Rimm ER, Katan MB, Ascherio A, Stampfer M, Willet W. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125: 384-389.
138. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349: 699.
139. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1489-1494.
140. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 943-949.
141. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 560-568.
142. Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M et al. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 2001; 12: 62-67.